

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ  
РЕСПУБЛИКИ  
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
НАРЫНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи  
УДК 615.3.032.8:616.1/9:577.3:575.23

**ТОЯЛИЕВ СУЛТАНБЕК**

**ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ФАРМАКОТЕРАПИИ И ТЕЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО  
ПРОЦЕССА В ГОРНОЙ МЕСТНОСТИ**

14.00.25 - фармакология  
03-00.02 - биофизика

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Бишкек - 2001**

Работа выполнена на кафедре фармакологии Кыргызской государственной медицинской академии и на кафедре физики и естествознания Нарынского государственного университета

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**А.З.Зурдинов**

кандидат биологических наук,  
доцент

**Т.Б.Атанаев**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**А.Н. Яворский**

доктор медицинских наук,  
профессор

**М.П. Шерстнев**



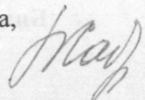
**Ведущая организация:** Государственный Университет медицины и фармации им. Николая Тестемищану Республики Молдова

Защита диссертации состоится "14" сентября 2001 г. в "14" часов на заседании диссертационного совета К 14.01.156 в Кыргызской государственной медицинской академии по адресу: 720061, г. Бишкек, Ахунбаева, 92.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан "1" 08 2001 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук, доцент

 **Т.С. Сабирава**

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

Актуальность исследования. Изучение влияния различных факторов окружающей среды на здоровье и работоспособность людей, проживающих в условиях высокогорья, всегда представляло большой научно-практический интерес для ученых Кыргызстана [Слоним А.Д., 1980; М.М.Миррахимов и соавт., 1985; М.И.Китаев и соавт., 1990; С.Б.Данияров, 1995; Турусбеков Б.Т., 1998; Тухватшин Р.Р., 2000; Шаназаров А.С., 1999, 2000; J.Z.Zakirov et al., 1994]. Причем важное значение придается определению и выяснению характера изменений физиологических параметров организма людей в горных условиях, изучению механизмов развития патологических состояний, что имеет важное значение при проведении профилактических, лечебных и реабилитационных вмешательств.

Одним из широко используемых и чувствительных биофизических методов, позволяющих изучать процессы на молекулярно-клеточном уровне, является хемилюминесцентный анализ биологических объектов [Ю.А.Владимиров, 1991; М.П.Шерстнев, 1991; J.Bird, J.Giroud, 1984], который как экспресс-метод, позволяющий изучать наиболее ранние и неспецифические механизмы нарушения защитно-приспособительных реакций организма, представляет интерес как в теоретическом, так и прикладном плане.

Информация, полученная с помощью хемилюминесцентного метода анализа, позволяет контролировать эффективность проводимого лечения у больных, прогнозировать течение и исход заболевания, а также изучать отдельные свойства лекарственных средств [Л.П.Абрамова, 1991; 1996; Б.М.Винер и соавт., 1992; М.Т.Нанаева и соавт., 1995; А.З.Зурдинов и соавт., 1999; Р.С.Allen, 1986; Т.Shibuya et al., 1986; Р.А.Benay, 1987].

К преимуществам метода биохемилюминесценции относят незначительные затраты времени и реактивов, а также отсутствие в необходимости специальных лабораторных условий для проведения анализа.

Использование различных активаторов позволяет получить информацию о ходе определенных стадий хемилюминесцентных реакций, которые они специфически активируют. Так, по данным Г.М.Никитиной и соавт. (1984), родамин Ж и бЖ образуют комплексы со свободными жирными кислотами (6:1). Возможно, такие же комплексы с жирными кислотами образуются и в липидах, что приводит к активации хемилюминесценции [Т.Б.Атанаев и соавт., 1990], сопровождающей перекисное окисление липидов.

Поэтому поиск различных активаторов хемилюминесценции биологических систем, с одной стороны, может привести к выявлению соединений, повышающих квантовый выход ХЛ, а с другой - выяснению механизмов развития свечения в результате химической реакции.

Из существующих активаторов железоиницированной хемиллюминесценции нильский синий (НС) является наиболее эффективным [Т.К.Азимбаев, 1993]. Однако, свойства этого активатора были изучены недостаточно, остались невыясненными вопросы относительно активирующей способности НС и механизма его действия. В этой связи дальнейшее его исследование представляет как теоретический, так и практический интерес.

Цель работы: определение возможности применения метода био-хемиллюминесценции в горных условиях для мониторинга фармакотерапии и оценки течения патологического процесса при различных заболеваниях, а также изучения новых фармакологических средств.

В соответствии с целью исследования решались следующие задачи:

- провести биохемиллюминесцентный мониторинг состояния перекисного окисления липидов (ПОЛ) при некоторых неинфекционных и инфекционно-паразитарных заболеваниях, а также оценить эффективность лекарственной терапии у больных в условиях горных регионов;
- изучить антиоксидантные и фармакотерапевтические свойства новых фармакологических средств с помощью активированной хемиллюминесцентной системы;
- исследовать активирующую способность нильского синего на основе модельной хемиллюминесцентной системы желточных липопротеидов;
- определить возможность применения активированной нильским синим хемиллюминесценции для изучения антиоксидантных свойств лекарственных препаратов.

Научная новизна. Для изучения процесса свободно-радикального окисления липидов биосред людей, проживающих в горных условиях Кыргызстана, предложено применение метода хемиллюминесценции (ХЛ), ранее не использованное в практике медицинских учреждений данного региона с использованием различных активаторов. На основе данного метода проведен мониторинг течения патологических процессов и эффективности фармакотерапии при некоторых неинфекционных и инфекционно-паразитарных заболеваниях. С применением хемиллюминесцентного метода анализа впервые изучены антиоксидантные свойства новых фармакологических веществ, а также оценена их терапевтическая эффективность.

Показано, что способность нильского синего усиливать железоиницированную хемиллюминесценцию (ЖХЛ) модельной биосистемы связана только со свойствами нильского синего как химического соединения, а не с примесью в препарате нильского красного. При этом установлено, что нильский красный также является активатором железоиницированной хемиллюминесценции желточных липопротеидов.

Практическая значимость работы. Результаты наших исследований являются основанием для широкого применения метода активированной хемиллюминесценции в лечебно-профилактических учреждениях горных регионов с целью определения тяжести течения некоторых неинфекционных и инфекционно-паразитарных заболеваний, а также проведения мониторинга фармакотерапии и установления реальных сроков пребывания больных в стационаре.

Для новых лекарственных препаратов установлены дозовая и концентрационная зависимости их влияния на процессы свободно-радикального окисления липидов, что особенно важно при их применении в клинике. Экспериментальными исследованиями доказана, что эффективность БАД «Green Magic» при стоматологических заболеваниях связана с ее антиоксидантной активностью. В модельных опытах выявлена более высокая антиокислительная активность нового экстракта из плодов облепихи, сравнительно с обычным маслом облепихи.

Оценена возможность использования нильского синего в качестве активатора железоиницированной хемиллюминесценции биосред для изучения антиоксидантных свойств фармакологических препаратов.

Внедрение. Материалы диссертационной работы внедрены в Нарынскую областную больницу, в учебный процесс кафедры фармакологии Кыргызской государственной медицинской академии и кафедры физики и естествознания Нарынского государственного университета.

Апробация работы. Отдельные фрагменты диссертационной работы доложены на научно-практической конференции по хирургии печени, желчных путей и поджелудочной железы с международным участием "Актуальные вопросы хирургии печени и желчных путей и поджелудочной железы" (Нарын, июль 1998 г.); IV Международном симпозиуме "Проблемы саногенного и патогенного эффектов экологического воздействия на внутреннюю среду организма" (Бишкек, июль 1999 г.); на совместном заседании кафедры физики и естествознания, химии и биологии Нарынского государственного университета с участием сотрудников отделений хирургии и кардиологии Нарынской областной больницы (г. Нарын, декабрь, 2000 г.); Республиканской научно-практической конференции медиков. "Медицина на стыке тысячелетий" (Бишкек, апрель 2000 г.); III Российском научном форуме хирургия 2001 "Достижения современной хирургии" (Москва, 2001 г.).

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Метод активированной хемиллюминесценции, индуцированный солями двухвалентного железа, позволяет оценить течение и тяжесть патологического процесса при некоторых неинфекционных и инфекционно-паразитарных заболеваниях в горных условиях.

2. Данные, полученные на основе метода биохемиллюминесценции, являются интегральным показателем оценки эффективности фармакотера-

пии у больных в горных условиях, при этом сроки окончания лечения пациентов могут определяться временем нормализации параметров ХЛ.

3. Ингибирование ПОЛ модельной системы препаратом «Green Magic» носит дозозависимый характер. Антиоксидантная активность биологически-активной добавки отмечается при концентрации 7,1 мг/мл и выше, в малых концентрациях (от 0,14 до 5,3 мг/мл) действие препарата проявляется прооксидантным эффектом.

4. Экстракт, полученный из плодов облепихи по новой оригинальной технологии, имеет более выраженные антиоксидантное и язвозаживляющее свойства, чем аптечное масло облепихи.

5. Хемиллюминесцентная модельная система на основе желточных липопротеидов, активированная нильским синим, может быть использована при исследовании антиоксидантных свойств лекарственных препаратов.

6. Добавление в модельную систему препарата нильского синего усиливает железониницированную хемиллюминесценцию желточных липопротеидов. Это усиление связано только со свойствами нильского синего как химического соединения, а не с примесью в препарате нильского красного. При этом нильский красный также усиливает ЖХЛ желточных липопротеидов, однако его активирующая способность несколько меньше, чем у нильского синего.

**Публикации:** по теме диссертации опубликовано 9 работ, в т.ч. 8 статей.

**Структура и объем диссертации:** Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит: из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования и двух глав, содержащих данные собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, приложения. Результаты исследований проиллюстрированы 15 рисунками, 18 таблицами. Библиография представлена 140 источниками литературы, в т.ч. 42 - на английском языке.

**Материалы и методы исследований.** Для решения комплекса поставленных задач нами использованы биофизические, биохимические, экспериментально-клинические и статистические методы исследования.

Под наблюдением соответствующих специалистов профильных отделений находились 128 больных, из них: с нарушениями системы кровообращения - 30; с ишемической болезнью сердца (ИБС) - 19; с отдаленными последствиями облучения - 9, с гнойно-воспалительными и паразитарными заболеваниями печени 70 человек. В качестве контроля был обследован 111 здоровых лиц.

Все больные на период проведения исследований находились на стационарном лечении в Центральной областной больнице г.Нарын (высокогорье) и в отделении профпатологии Национального госпиталя (г.Бишкек, низкогорье).

В качестве экспериментальных животных использованы 24 белые крысы массой 150-200 г. В первую группу входили интактные животные (контрольная группа); во вторую - с иммобилизационным стрессом, получавшие в течение 1 недели перорально по 1,5-2 мл физиологического раствора; в третью и четвертую - с той же модельной патологией, получавшие перорально эквивалентный объем аптечного облепихового масла и экстракта из плодов облепихи, полученный по новой технологии.

Биофизические исследования проводили по известным методикам, опубликованным в литературе (М.П.Шерстнев, 1989; Т.Б. Атанаев, 1990; Т.К. Азимбаев, 1993). Учитывались следующие основные параметры: амплитуда быстрой и медленной вспышек свечения, интенсивность стационарной хемиллюминесценции и время достижения максимума амплитуды стационарной ХЛ.

Полученные данные подвергались компьютерной обработке с помощью пакета программ Microsoft Excel и расчета критериев Стьюдента, Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Изучение свободно-радикального окисления липидов крови у больных с нарушениями системы кровообращения.

В наших исследованиях, проведенных в горных условиях, была изучена хемиллюминесценция апо-В содержащих липопротеидов (ЛП) крови людей, страдающих нарушениями системы кровообращения до и после проведения соответствующей фармакотерапии (табл. 1)

Таблица 1  
Показатели активированной роданином Ж хемиллюминесценции апо-В содержащих липопротеидов крови у больных с нарушениями системы кровообращения до и после лечения

Параметры ХЛ	Контроль	Б-ные с наруш. с-мы кровообращ.	
		до лечения	после лечения
Количество - n	33	30	15
1. Ампл-да быстрой ХЛ (h), абс. ед.	11,3±0,9	16,2±0,9*	12,1±0,8**
2. Ампл-да максим. стац. ХЛ (Hmax), абс. ед.	12,7±1,3	17,2±1,0*	11,6±1,1**
3. Ампл-да стац. ХЛ, абс. ед.	7,1±0,4	11,6±0,8*	8,4±0,7**

Примечание: \* -  $p < 0,001$  между показателями ХЛ здоровых и больных людей; \*\* -  $p < 0,001$  между показателями ХЛ больных до и после лечения

Из табл. 1 видно, что все показатели ХЛ апо-В содержащих липопротеидов крови больных после лечения снизились до уровня практически здоровых лиц.

Максимум амплитуды стационарной ХЛ после лечения у больных уменьшился в 1,5 раза. Аналогичный результат был получен и по интенсивности быстрой вспышки хемиллюминесценции.

Анализ результатов наших исследований позволяет сделать следующие выводы: светосумма излучения хемиллюминесценции апо-В содержащих липопротеидов плазмы крови больных с нарушениями системы

кровообращения на 35-39% выше, чем у практически здоровых лиц; проведение соответствующей фармакотерапии позволяет нормализовать уровень перекисного окисления липидов крови больных.

#### Изучение свободно-радикального окисления липидов крови у больных с коронарной болезнью сердца

В условиях горного региона, нами была изучена хемилюминесценция апо-В содержащих липопротеидов крови у больных с ИБС до и после проведения им соответствующего курса лечения.

Если интенсивность ХЛ апо-В содержащих липопротеидов крови у больных с ИБС до лечения составляла по трем параметрам (быстрая, медленная и стационарная вспышки ХЛ):  $18,6 \pm 1,6$ ;  $20,6 \pm 0,7$ ;  $13,5 \pm 1,5$  абс. ед. соответственно, то после лечения -  $12,1 \pm 0,8$ ;  $11,6 \pm 1,1$ ;  $8,4 \pm 0,7$  абс. ед. ( $p < 0,001$ ).

Результаты наших исследований согласуются с экспериментальными данными М.П.Шерстнева и соавт. (1991).

Таким образом, результаты настоящих исследований позволяют сделать следующие выводы: хемилюминесцентная вспышка апо-В содержащих липопротеидов крови больных ишемической болезнью сердца в 1,4-1,6 раза выше, чем у практически здоровых людей, что свидетельствует об интенсификации процесса ПОЛ при данном заболевании; в результате проведенной фармакотерапии у данных больных нормализовался уровень свободно-радикального окисления липидов плазмы крови, что коррелирует с клинической симптоматикой.

Изучение свободно-радикального окисления липидов крови у людей с отдаленными последствиями радиационного облучения. Нами была проведена сравнительная оценка ПОЛ крови здоровых людей и ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС до и после проведения им лекарственной терапии.

Все «чернобыльцы» являлись жителями Нарынской области, проживающими в условиях высокогорья.

В зависимости от течения основной патологии и сопутствующих заболеваний фармакотерапия пациентов проводилась лекарственными препаратами из различных групп: психотропные средства; препараты, улучшающие кровоток в мозговых сосудах; витаминные; биогенные стимуляторы и др.

Оценка светосуммы хемилюминесценции плазмы крови, рассчитанная по интенсивности стационарной ХЛ и времени его достижения, показала, что у «чернобыльцев» она была на 18% выше, чем у контрольной группы. Отсюда следует, что в крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС свободно-радикальное окисление липидов идет более активно, что свидетельствует об интенсификации процесса ПОЛ на уровне всего организма.

Таким образом, светосумма хемилюминесценции плазмы крови ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС на 18% выше, чем у практически здоровых людей; проведенная комплексная фармакоте-

рапия позволила снизить светосумму хемилюминесценции плазмы крови «чернобыльцев» до уровня практически здоровых людей.

#### Состояние свободно-радикального окисления липидов при некоторых гнойно-воспалительных и паразитарных заболеваниях печени.

Как видно из таблицы 2, амплитуда люминолзависимой хемилюминесценции цельной крови у больных данной группы был в 3-8 раз выше, чем у практически здоровых лиц. Причем, в зависимости от степени тяжести патологического процесса в печени, наблюдалось усиление интенсивности ХЛ крови больных.

Таблица 2

Люминолзависимая хемилюминесценция при некоторых гнойно-воспалительных и паразитарных заболеваниях печени

№ п/п	Степень тяжести	Количество (n)	Амплитуда ХЛ $\times 10^5$ квант/4л $\times$ с	
			до лечения	после лечения
1.	Контроль	30	$3,7 \pm 0,9$	-
2.	Тяжелая	11	$29,8 \pm 3,7^*$	$6,9 \pm 1,3^{**}$
3.	Средняя	35	$20,5 \pm 2,7^*$	$6,1 \pm 1,7^{**}$
4.	Легкая	24	$11,3 \pm 1,1^*$	$5,8 \pm 0,9^{**}$

Примечание: \* -  $p < 0,001$  - между показателями ХЛ больных и здоровых; \*\* -  $p < 0,05$  - между показателями ХЛ здоровых и больных после лечения

После проведения больным соответствующих хирургических и терапевтических вмешательств, а также после стабилизации их состояния, нами был проведен повторный анализ биохемилюминесценции цельной крови. При этом было установлено, что амплитуда люминолзависимой ХЛ цельной крови пациентов уменьшилась в 2-4 раза (табл.2), по сравнению с таковым показателем до лечения. Хотя интенсивность ХЛ все еще оставалась несколько выше, чем у практически здоровых лиц.

Исходя из полученных данных можно предположить, что снижение интенсивности хемилюминесценции крови происходит вследствие проведенного лечения, в результате которого из организма элиминируются различные токсические вещества, в том числе и продукты перекисного окисления липидов при хирургическом удалении пораженной ткани.

Таким образом можно заключить, что в основном метод активированной хемилюминесценции биосред человека дает неспецифическую информацию о степени тяжести состояния больных, выраженности развития патологического процесса, форме и стадии заболевания, а также позволяет оценить эффективность проводимого лечения.

#### Изучение антиоксидантных свойств биологически-активной добавки «Green Magic» с помощью активированной родамином Ж хемилюминесценции.

Результаты исследований показали, что влияние препарата «Green Magic» на процесс перекисного окисления липидов модельной системы в условиях *in vitro* имеет четко выраженный дозозависимый характер

(рис. 1, 2). Из рис. 1 и 2 видно, что при введении в реакционную среду препарата в интервале конечной концентрации от 0,14 до 1,38 мг/мл происходило увеличение интенсивности стационарной ХЛ модельной системы. Эти результаты свидетельствуют о том, что в данном диапазоне концентраций БАД обладает ярко выраженным прооксидантным эффектом, т.е. повышает способность ненасыщенных жирных кислот (НЖК) подвергаться свободно-радикальному окислению.

Дальнейшее увеличение концентрации изучаемой БАД (от 1,38 мг/мл до 5,3 мг/мл) приводило к снижению интенсивности максимальной стационарной ХЛ модельной системы.

Хотя следует отметить, что при этом данный показатель оставался несколько выше контрольной величины, без введения БАД. Интересно, что время достижения максимума вспышки ХЛ, которое характеризует антиокислительные свойства реакционной среды, в диапазоне конечных концентраций препарата 0,14-3,6 мг/мл возрастало. Однако в интервале концентраций 3,6-7,1 мг/мл этот показатель, наоборот, снижался.

Наибольшая тушающая активность биологически-активной добавки «Green Magic», в отношении оцениваемых параметров хемилюминесценции, была установлена при конечной концентрации препарата 7,1 мг/мл и выше.

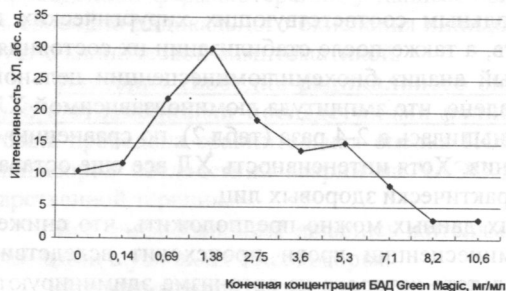


Рис. 1. Зависимость абсолютной величины интенсивности максимальной стационарной вспышки хемилюминесценции желточных липопротеидов, активированной родамином Ж в присутствии ионов двухвалентного железа, от конечной концентрации БАД «Green Magic».

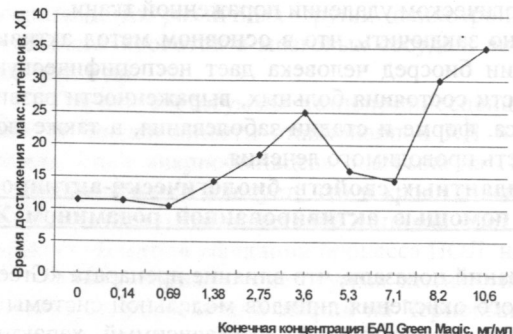


Рис. 2. Зависимость величины времени достижения максимальной интенсивности стационарной хемилюминесценции желточных липопротеидов, активированной родамином Ж в присутствии ионов двухвалентного железа, от конечной концентрации БАД «Green Magic». Состав реакционной среды, как на рис. 1

На основе результатов экспериментальных исследований можно сделать следующие выводы: действие препарата «Green Magic» на модельную биологическую систему в малых концентрациях (от 0,14 до 5,3 мг/мл) проявляется прооксидантным эффектом; способность изучаемой БАД ингибировать процесс перекисного окисления липидов носит дозозависимый характер, наибольшая антиоксидантная эффективность отмечается при концентрации 7,1 мг/мл и выше.

**Изучение антиоксидантных свойств препаратов облепихи с помощью активированной родамином Ж и нильским синим хемилюминесценции.** Как известно, антиоксидантными свойствами обладает облепиховое масло. На кафедре фармакологии Кыргызской государственной медицинской академии изучается экстракт из плодов облепихи, полученный по новой технологии, содержание каротина и каротиноидов в нем составляет более 320 мг%.

В этой связи было интересно провести сравнительную оценку антиоксидантных свойств аптечного облепихового масла и экстракта облепихи с помощью метода биохемиллюминесценции. Из табл. 3. видно, что добавление обоих препаратов в модельную систему активированной родамином Ж в объеме 0,1 мл приводило к снижению интенсивности быстрой вспышки в 2 раза, а стационарной ХЛ биосистемы в 1,3 раза только для случая с маслом облепихи. Тогда как добавление экстракта облепихи полностью гасило вспышку свечения суспензии ЖЛП на данной стадии развития хемиллюминесценции. Причем необходимо подчеркнуть, что такой же эффект наблюдался при уменьшении объема экстракта до 0,02 мл.

Таблица 3.

**Влияние облепихового масла и экстракта из плодов облепихи на параметры активированной родамином Ж хемиллюминесценции суспензии желточных липопротеидов**

Параметры ХЛ	Контроль	Облепих. масло	Облепих. экстракт	Оценка критерия t
1. Амплитуда быстрой вспышки (абс. ед.)	14,6±1,5	7,4±0,8*	8,8±1,0*	p<0,05 p>0,05*
2. Макс. амп. стационарной вспышки (абс. ед.)	13,9±0,5	9,7±0,4	0	p<0,001
3. Время достижения макс. стац. вспышки (мин.)	10,2±1,6	14,3±0,7	-	p<0,05

На основании этих данных можно предположить, что препараты облепихи обладают как антиокислительным, так и антирадикальным свойствами. При этом хемиллюминесценция модельной системы обусловлена протеканием свободно-радикальных процессов в липидной и водной фазах. Время достижения максимума интенсивности стационарной вспышки ХЛ, которое характеризует антиокислительные свойства объекта окисле-

ния, при добавлении масла облепихи в стандартную среду увеличилось в 1,4 раза.

Исходя из данных литературы можно предположить, что угнетение процессов свободно-радикального окисления при добавлении препаратов облепихи, связано с непосредственным антирадикальным и мембраностабилизирующим действием составляющих изучаемых средств. При этом высокое содержание отмеченных веществ в экстракте из плодов облепихи, возможно, и объясняет его большую антиоксидантную эффективность по сравнению с таковым аптечного масла облепихи.

Из литературных данных известно, что наиболее эффективным активатором железоиницированной хемиллюминесценции является нильский синий. Использование нильского синего в качестве активатора железоиницированной хемиллюминесценции ЖЛП позволит определить более уточненное значение антиоксидантной активности экстракта облепихи, вследствие чего нами повторялся эксперимент по схеме предыдущего опыта.

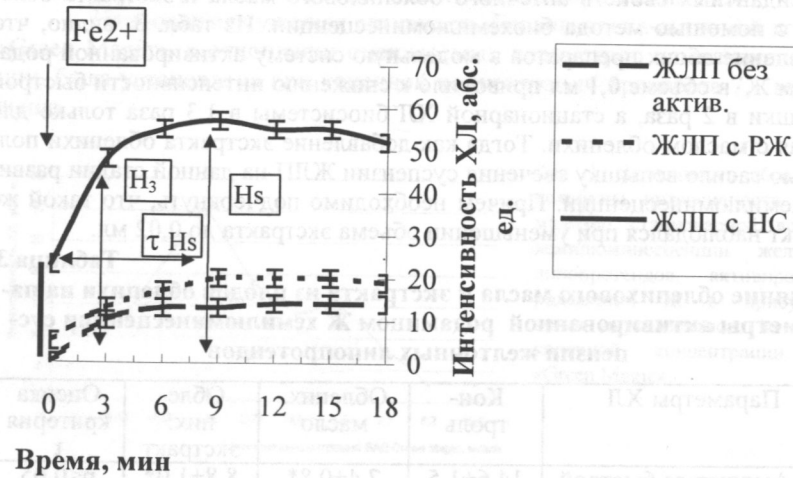


Рис. 3. Кинетика активированной нильским синим и родамином Ж железоиницированной хемиллюминесценции желточных липопропротеидов в фосфатном буфере

Как видно из рис. 3, применение нильского синего позволило увеличить интенсивность стационарной хемиллюминесценции желточных липопропротеидов в 3 раза, чем при использовании родамина Ж. Однако, на стадии быстрой вспышки ХЛ модельная система с родамином Ж имела большее значение интенсивности свечения (в 5 раз), чем таковая с нильским синим. Отсюда видно, что нильский синий увеличивает интенсивность свечения преимущественно на стадии стационарной хемиллюминесценции. Следует отметить, что результаты наших анализов согласуются с данными Ю.А.Владимирова и соавт. (1992) и Т.К.Азимбаева (1993).

При добавлении как аптечного масла облепихи, так и экстракта из плодов облепихи в модельную систему, активированной нильским синим в объеме 0,02 мл, происходило снижение амплитуды быстрой вспышки в 1,8 и 1,9 раза соответственно. Интенсивность стационарной ХЛ биосистемы при введении масла облепихи уменьшалась в 1,5 раза, а добавление концентрата облепихи приводило к полному тушению хемиллюминесценции. Латентный период достижения максимума стационарной ХЛ, как и в первом случае, при добавлении масла облепихи в систему с желточными липопропротеидами увеличился в 1,3 раза.

На основе косвенных расчетных данных по объему и активирующей способности НС можно предположить, что антиоксидантная активность экстракта из плодов облепихи, полученной по новой технологии, на порядок (примерно в 10 раз) больше, чем таковая аптечного масла облепихи.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение влияния масла и экстракта из плодов облепихи на процессы перекисного окисления липидов сыворотки крови экспериментальных животных в условиях модельной патологии.

Из табл. 4. видно, что показатели ХЛ сыворотки крови крыс со стрессорными язвами желудка были достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем таковые практически здоровых особей.

Таблица 4  
Показатели хемиллюминесценции сыворотки крови крыс при модельной патологии

Параметры ХЛ	Контр. группа	С иммоб. стрессом	Облепиховое масло	Экстракт из плодов облепихи
n	6	6	6	6
Быстрая ХЛ - h, абс. ед.	9,9±2,0	5,5±1,2*	6,5±0,3***	12,5±4,1***
Макс. стац. ХЛ - Hs, абс. ед.	3,5±0,3	2,0±0,3*	1,8±1,2***	4,7±0,7***
Время достиж. макс. стац-ной ХЛ - τ Hs, мин	9,5±2,2	2,3±2,1*	5,3±0,8**	4,4±1,4**

Примечание: \* -  $p < 0,05$  между показателями ХЛ контрольной группы животных и с иммобилизационным стрессом; \*\* -  $p < 0,05$  между показателями ХЛ контрольной группы животных и с иммобилизационным стрессом после лечения; \*\*\* -  $p > 0,05$  между показателями ХЛ контрольной группы животных и с иммобилизационным стрессом после лечения

Анализ полученных данных показывает, что через недельный срок у крыс с острым стрессом, наряду с уменьшением в 2-3 раза параметров ХЛ сыворотки крови, отмечается снижение в 2 раза общего количества ЛПОНП и ЛПНП крови по отношению таковых показателей практически здоровых особей.

Результаты наших исследований согласуются с данными литературы (В.И.Сергиенко и соавт., 1977).

Анализ данных экспериментальных исследований показывает, что при моделировании патологического процесса в организме животных,

наряду с установлением патоморфологических изменений, имеет место изменения в процессах перекисного окисления липидов и метаболизма липопротеидов крови.

Показатели хемилюминесценции сыворотки крови экспериментальных животных, которым в течении недели вводили масло (МО) и экстракт(ЭО) облепихи, по быстрой (h) и стационарной (Hs) вспышкам достоверно не отличались ( $p > 0,05$ ) от таковых практически здоровых особей (табл. 4).

Время достижения максимума стационарной ХЛ характеризует антиоксидантные свойства сыворотки крови. Данный параметр у животных с острым стрессом, принимавших препараты облепихи, незначительно отличался от таковых показателей практически здоровых особей. Отсюда видно, что препараты облепихи значительно повысили антиоксидантные свойства сыворотки крови крыс с острым стрессом.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: через недельный срок после иммобилизационного стресса у экспериментальных животных отмечается снижение хемилюминесценции сыворотки крови в 2-3 по сравнению с контролем; введение животным с острым стрессом препаратов облепихи способствует восстановлению исходного уровня хемилюминесценции сыворотки крови, при этом экстракт из плодов облепихи обладает большей биологической активностью, чем аптечный препарат масла облепихи.

Таким образом, экстракт, полученный из плодов облепихи по новой технологии, значительно превосходит по лечебному эффекту аптечное масло облепихи.

**Концентрационная зависимость активированной нильским синим хемилюминесценции желточных липопротеидов.** Результаты экспериментальных исследований показали, что при конечной концентрации нильского синего в 1,6 мкМ происходило равномерное усиление ХЛ практически на всех этапах развития свечения.

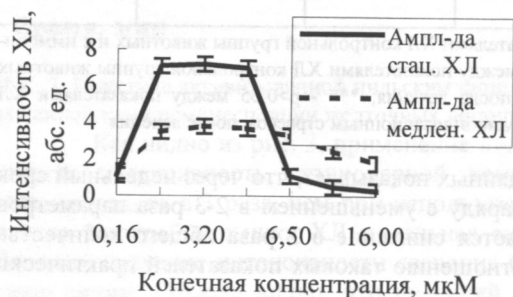


Рис. 4. Зависимость между интенсивностью стационарной хемилюминесценции, амплитудой медленной вспышки и конечной концентрацией нильского синего в пробе

На рис. 4 показаны кривые зависимости между амплитудой медленной вспышки, интенсивностью стационарной хемилюминесценции и конечной концентрацией нильского синего. Как видно из рисунка, интенсивность стационарной ХЛ быстро увеличивается при повышении конечной концентрации нильского синего до 1,6 мкМ, далее кривая выходит на плато и, начиная с 5 мкМ, идет резкое снижение учитываемого показателя ХЛ. Активирующая способность нильского синего в отношении медленной вспышки ХЛ была выражена в меньшей степени.

Таким образом, из результатов видно, что нильский синий является активатором стационарной ХЛ суспензии желточных липопротеидов. Полученные данные представляют определенный интерес для медико-биологических исследований, так как именно эта стадия железоиницированной хемилюминесценции липидсодержащих объектов характеризует способность ненасыщенных жирных кислот подвергаться перекисному окислению липидов.

**Гетерофазное разделение производных аминоксантина.** По данным В.Б.Гаврилова и соавт. (1993), нильский синий содержит некоторую примесь нильского красного. Нильский красный (НК) обладает интенсивной флуоресценцией при растворении в гидрофобной фазе, при этом в водной фазе НК флуоресценцией практически не обладает. Соотношение распределения НК и НС в гидрофобной фазе составляет примерно 200:1. Исходя из того, что процессы перекисного окисления липидов протекают преимущественно в гидрофобной фазе [Ю.А.Владимиров и др., 1991], естественно предположить, что активация хемилюминесценции биологических объектов происходит за счет примеси нильского красного, который, как известно, хорошо растворяется в липидной фазе.

Таблица 5  
Амплитуда стационарной хемилюминесценции желточных липопротеидов после инкубации водного раствора нильского синего с различными органическими растворителями

№ п/п	Исследованные системы	Ампл-да стац. ХЛ (абс. ед.)	
		водной фазы	гидрофоб. фазы
1.	Контроль - водный раствор НС без инкубации с гидрофобным раст-лем	11,0±0,8	-
2.	После инкубации с деканом	9,6±1,1	1,6±0,1
3.	После инкубации с гексаном	8,7±1,7	0,8±0,6
4.	После инкубации с пентаном	7,3±1,3*	5,1±0,9
5.	После инкубации с толуолом	9,2±1,7	0
6.	Желточные ЛП без активатора	1,3±0,8	-

Примечание: \* -  $p < 0,05$  относительно значения амплитуды стационарной ХЛ контрольной системы при добавлении водного раствора НС без инкубации

Для проверки этого предположения мы инкубировали водный раствор нильского синего (с концентрацией 1 мМ) с различными гидрофобными растворителями в соотношении 1:1 (2 мл+ 2 мл) в течение 1 ч при интенсивном перемешивании через каждые 15 мин. В качестве гидро-



фобных растворителей использовали декан, гексан, пентан и толуол. Разделение фаз осуществляли путем отстаивания в течение 12 ч после последнего перемешивания с помощью делительной воронки. Далее измеряли железиницированную ХЛ желточных липопротеидов при добавлении как водного раствора нильского синего, так и предполагаемого раствора нильского красного в гидрофобном растворителе. После инкубации с водным растворителем нильского синего, декан и гексан не изменяли цвет, пентан приобрел синий цвет, соответствующий цвету НС, а толуол приобрел красный цвет, соответствующий цвету НК.

Из табл. 5 видно, что активирующей способностью, после гетерофазной инкубации, обладали только водные растворы нильского синего.

Незначительное снижение активирующей способности водного раствора НС, после инкубации его с пентаном, возможно, объясняется тем, что часть нильского синего перешло в пентан.

В результате гетерофазной инкубации НС с толуолом, примесь нильского красного в нильском синем перешла в растворитель, что подтверждалось его окрашиванием в красный цвет. Как видно из табл. 5, значения интенсивностей быстрой вспышки ХЛ как при добавлении водного раствора НС, после инкубации с толуолом, так и без нее, не имели достоверного различия.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что способность препарата нильского синего активировать железиницированную хемилуминесценцию желточных липопротеидов связана только со свойствами нильского синего как химического соединения, а не наличием в нем примеси нильского красного.

**Сравнительная оценка активирующей способности нильского синего и нильского красного.** Как видно из рис. 5, нильский красный, растворенный в диметилформамиде, активирует ЖХЛ, как и нильский синий в водном растворе. Следует также отметить, что в обоих случаях характер кривой кинетики существенно не изменяется и усиление вспышки ХЛ происходит преимущественно на стадии стационарного свечения.

В связи с тем, что нильский красный был растворен в ДМФА, а нильский синий в воде, мы повторили предыдущий эксперимент, но уже растворив нильский синий в том же растворителе (рис. 6). Как видно, амплитуда стационарной хемилуминесценции, активированной НС, выше амплитуды стационарной ХЛ, активированной НК на 25% ( $p < 0,001$ ). Это, возможно, объясняется тем, что нильский синий растворяется в ДМФА не образуя эксимеров.

Полученные в ходе исследований данные свидетельствуют о том, что нильский синий и нильский красный отличаются по своему действию от известных активаторов хемилуминесценции. При этом было установлено, что нильский красный, растворенный в диметилформамиде, также является активатором железиницированной ХЛ модельной биосистемы.

Наибольшая активирующая способность НС и НК отмечается при концентрациях веществ 2-4 мкМ.

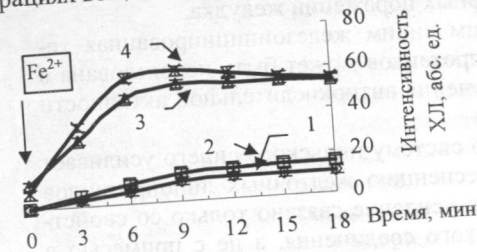


Рис. 5. Кинетика активированной нильским синим(4) и нильским красным(3) железиницированной хемилуминесценции желточных липопротеидов в фосфатном буфере. (1 – без активатора, 2 – активатором РЖ)

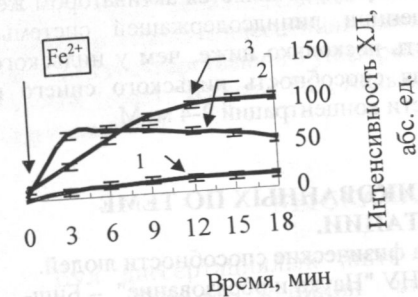


Рис. 6. Кинетика активированной нильским синим(3) и нильским красным(2) железиницированной хемилуминесценции желточных липопротеидов в фосфатном буфере. (1 – без активатора)

В связи с тем, что многие биологические объекты имеют низкую собственную хемилуминесценцию, использование нильского синего в качестве активатора представляется одним из перспективных направлений медико-биологических исследований.

## ВЫВОДЫ

1. Биохемилуминесцентный анализ может использоваться в качестве экспресс-метода для оценки тяжести течения патологического процесса в условиях клинических больниц горных районов. Метод легко воспроизводится и быстро выполняем, не требует создания специальных условий.
2. Хемилуминесцентный мониторинг фармакотерапии позволяет объективно оценить ее эффективность при ряде распространенных заболеваний.
3. Хемилуминесцентный метод позволяет оценить антиоксидентную активность новых биологически активных веществ и прогнозировать их эффективность при патологических изменениях в ряде органов и тканей. Ингибирование реакций свободно-радикального окисления липидов БАД «Green Magic» носит дозозависимый характер, коррелирующий с его лечебным действием при заболеваниях пародонта. Экстракт из плодов



облепихи более выражено ингибирует железоиницированное перекисное окисление липидов, сравнительно с маслом облепихи, что отражается на скорости восстановления стрессорных поражений желудка.

4. Активированная нильским синим железоиницированная хемиллюминесценция желточных липопротеидов может быть использована в качестве модельной системы для изучения антиокислительной активности лекарственных препаратов.

5. Добавление в модельную систему нильского синего усиливает железоиницированную хемиллюминесценцию желточных липопротеидов преимущественно в водной фазе. Это усиление связано только со свойствами нильского синего как химического соединения, а не с примесью в препарате нильского красного.

6. Установлено, что нильский красный является активатором железоиницированной хемиллюминесценции липидсодержащей системы, однако его активирующая способность несколько ниже, чем у нильского синего. Максимальная активирующая способность нильского синего и нильского красного находится в области концентраций 2-4 мкМ.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Влияние факторов высокогорья на физические способности людей. //Сб. научных трудов ИИМОП КГНУ "Наука и образование". – Бишкек, 1999. – Н-34 ВЫП.1-Б. – С. 68-74. (соавт.: Атанаев Т.Б.)
2. Возможности применения клеточной хемиллюминесценции в хирургии. //Сб. научных трудов 1-ой Республиканской конференции с международным участием. "Актуальные вопросы хирургии печени, желчных путей и поджелудочной железы." – Нарын, 1998. – С. 27-29. (соавт.: Атанаев Т.Б., Жоробеков А.Д.)
3. Роль хемиллюминесцентных исследований в клинической медицине. //Сб. научных трудов КГМА "Проблемы саногенного и потогенного эффектов экологического воздействия на внутреннюю среду организма". – Бишкек, 1999. – Ч.2. – С. 47-52. (соавт.: Зурдинов А.З., Атанаев Т.Б., Кулданбаев Н.К.)
4. Перекисное окисление липидов при ишемической болезни сердца в условиях высокогорья. //Сб. научных трудов КГМА "Проблемы саногенного и потогенного эффектов экологического воздействия на внутреннюю среду организма", – Бишкек, – 1999. – Ч.2. – С. 125-130. (соавт.: Атанаев Т.Б., Зурдинов А.З., Кулданбаев Н.К.)
5. Хемиллюминесценция цельной крови при некоторых гнойно-воспалительных заболеваниях печени в условиях высокогорья. //Сб. научных трудов Республиканской научно-практической конференции медиков. "Медицина на стыке тысячелетий". – Бишкек, 2000. – С. 612-618.

6. Свободнорадикальное окисление липидов крови человека при нарушениях системы кровообращения в условиях высокогорья. //Вестник КГНУ "Наука и образование". – Бишкек, 2000. – вып. – 2. – С. 161-165.
7. Сравнительная оценка препаратов облепихи по их влиянию на параметры хемиллюминесценции и содержание липопротеидов у экспериментальных животных с модельной патологией. // "Медицина и фармация". – Бишкек, 2001. – №2. – С. 105-110. (соавт.: Кулданбаев Н.К., Жумагулова Ж.О., Зурдинов А.З.)
8. Эффективность хемиллюминесцентного метода при оценке состояния больных эхинококкозом. //Материалы III Российского научного форума. "Хирургия 2001. Достижения современной хирургии." – Москва, 2001 – С. 36-37. (соавт.: Атанаев Т.Б., Жоробеков А.Д.)
9. Активация хемиллюминесценции липопротеидов крови. //Вестник Нарынского государственного университета. – Нарын, 2001. – № 2. – С. 167-174. (соавт.: Атанаев Т.Б., Кадыралиев К.К., Джоробеков А., Андакулова Ж.А.)

#### КЫСКАЧА МАЗМУНУ

Бул диссертациялык иште атайын жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн негизинде тоо жеринин шартында ар кандай ооруларды даарылоонун жана сыркоонун жүрүшүн көзөмөлдөө үчүн активдештирилген биохемиллюминесценция методун колдонуу сунушталган.

Биохемиллюминесценция методунун негизинде, жугуштуу жана жугуштуу эмес орууларга чалдыккан адамдардын организмдеги липиддердин перекистик кычкылдануу абалын жана ошондой эле дарылоонун таасирин аныктоо мүмкүнчүлүгү такталды.

Эксперименталдык изилдөө иштеринин жыйынтыгы көрсөткөндөй темир менен күчөтүлгөн липопротеиддердин моделдик системасынын негизинде, хемиллюминесценция методун, жаңы дары заттарынын антиоксиданттык сапатын аныктоодо колдонууга болот.

Демек, тоо чөйрөсүндө биохемиллюминесценция методун колдонуу менен кыска убакыт арасында оорунун жүрүшүнө, дарылоонун жыйынтыгына жалпы жөнүнөн көзөмөл иретинде баа берүүгө болот.

#### АННОТАЦИЯ

В диссертационной работе предложено применение метода активированной биохемиллюминесценции в горных условиях для мониторинга

фармакотерапии и течения патологического процесса при различных заболеваниях.

На основе метода биохемилюминесценции проведен мониторинг состояния ПОЛ при некоторых неинфекционных и инфекционно-паразитарных заболеваниях, а также оценена эффективность проводимых терапевтических вмешательств.

Результаты экспериментальных исследований показали, что метод железоиницированной хемилюминесценции на основе модельной системы желточных липопротеидов может использоваться для определения антиоксидантных и фармакотерапевтических свойств новых фармакологических средств.

Метод биохемилюминесценции может быть использован для получения неспецифической информации о степени тяжести состояния больных, выраженности развития патологического процесса при различных нозологиях, а также для проведения мониторинга эффективности лечения в горных условиях.

#### ANNOTATION

In the dissertation, the application of the method of promoting biological chemical luminescence in mountainous conditions for monitoring of pharmacotherapy and the pathological process term at various diseases is suggested.

On the basis of the method of biological chemical luminescent, the monitoring of the status of dioxide oxide lipids at some non-infectious and infectious parasite diseases has been conducted; also, the effectiveness of applied treatments and medical actions has been estimated.

The results of the experimental investigations have proved that the method of iron initiated chemical luminescent on the basis of model system of yolk lipid protheid can be applied for determination of anti-oxidant and pharmacotherapy properties of the new pharmacological means.

The method of biological chemical luminescence can be applied for receipt a non-specific information about the level of severity of the patients' status, mark of the pathological process at various diseases; the method enabled to conduct a monitoring of effectiveness of medical actions in mountainous conditions.

Типография Института  
государственного управления и  
социальных исследований КГНУ.

Заказ № 187. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Тираж 100 экз.